

Evaluación de la tolerancia a Finale® en la germinación y regeneración *in vitro* de dos variedades cubanas de arroz (IACuba-17 e IACuba-19)

Daymí Abreu*, Maylin Pérez, Annerys González, Julio Alfonso, Onel Valdivia, Carlos Hernández y Raúl Armas.
Autor para correspondencia.

Departamento Investigaciones. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. Apartado 83. Sancti Spiritus. Cuba. CP 60 200. e-mail: daymi.abreu@cigb.edu.cu

RESUMEN

La eficiencia del proceso de obtención de plantas transgénicas depende, entre otros factores, del adecuado empleo del agente de selección durante el cultivo *in vitro* del material vegetal transformado. En este trabajo se evaluó la tolerancia de dos variedades cubanas de arroz, IACuba-17 e IACuba-19, al herbicida Finale® y se determinó la concentración mínima inhibitoria y las condiciones de incubación en la germinación de semillas y la regeneración de plantas a partir de callos. Concentraciones de 5 y 10 mg.l⁻¹ de Finale® en el medio de cultivo y diez días de incubación fueron suficientes para inhibir la germinación de semillas en IACuba-17 y 19, respectivamente. Callos cultivados (0, 2, 4, y 6 días) en el medio de cultivo de regeneración sin Finale® fueron posteriormente empleados para evaluar la concentración del agente, capaz de inhibir totalmente la formación de brotes durante la regeneración. La combinación de callos cultivados durante dos días y 3 mg.l⁻¹ de Finale® en el medio de cultivo de regeneración fue la más eficiente para la inhibición de la formación de brotes. Esta metodología de selección de brotes reduce de nueve a tres semanas el tiempo de cultivo *in vitro* del material vegetal durante el proceso de obtención de plantas transgénicas de arroz.

Palabras clave: agente de selección, fosfinitricina, germinación, *Oryza*, regeneración, semillas maduras

ABSTRACT

Selection agent used during the shoot selection has an important role on the transgenic plant generation efficiency. In this work, the tolerance to the herbicide Finale® in two Cuban rice cultivars, IACuba17 and IACuba-19 was evaluated, and determined that 10 days exposure to 5 and 10 mg.l⁻¹ of Finale® were enough to avoid seedlings of IAC-17 and IAC-19, respectively. Cultivated calluses (0, 2, 4 and 6 days) in the absence of Finale® in the regeneration medium were used to evaluate the minimal concentration of Finale® that totally inhibits shoot regeneration. Pre-induced calluses cultured during two days and 3 mg.l⁻¹ of Finale® in the regeneration medium was the most efficient combination to select shoots during the generation of transgenic plants resistant to the herbicide. Our shoot selection procedure reduces to 3 weeks the time to obtain shoots during the generation of transgenic rice plants.

Key words: germination, mature seeds, *Oryza*, phosphinothricin, regeneration, selection markers

INTRODUCCIÓN

Se estima que cada año, el arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado reduce en un 50% su rendimiento máximo teórico debido a problemas fitosanitarios entre los que se destacan plagas, enfermedades, malas hierbas y factores abióticos (Krattinger, 1997; Toenniessen, 1999).

Se considera que las malas hierbas infectan hasta el 80% de las áreas destinadas al cultivo del arroz, siendo este factor responsable de las mayores pérdidas que limitan su producción (Herd, 1991). La presencia de malezas taxonómicamente relacionadas, como lo es el arroz rojo, constituye un agravante debido a la imposibilidad de emplear herbicidas selectivos para su control.

La ingeniería genética posibilita obtener plantas transgénicas de arroz resistentes a herbicidas,

mediante la introducción de genes foráneos que codifican para proteínas capaces de conferir a las plantas la capacidad de soportar la aplicación de herbicidas de amplio espectro. Con esto se favorece el uso de productos de nueva generación, que tienen las ventajas de usar dosis reducidas, ser rápidamente degradados en el suelo y tener una toxicidad ambiental extremadamente inferior a la de los herbicidas selectivos que generalmente se utilizan.

Los herbicidas son potentes agentes de selección. Varios genes que confieren resistencia a herbicidas importantes comercialmente han sido aislados, tales como el que expresa glifosato oxirreductasa (GOX) en plantas, que confiere resistencia a glifosato (Barry, 1992). El gen *bar*, que codifica para la enzima fosfinitricina acetiltransferasa, es el gen marcador de selección más comúnmente usado en arroz (Cao *et al.*, 1992; Chirtesen *et al.*, 1992; Park, 1994; Toki, 1997; Goto *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000). Este gen

confiere resistencia a L-fosfinotricina (PPT), principio activo de varios herbicidas comerciales como el Finale que ha sido utilizado como agente de selección para la obtención de plantas transgénicas de arroz resistentes a dicho herbicida (Messeguer, 2001; 2004). La fosfinotricina actúa inhibiendo la enzima glutamino sintetasa que es responsable de la asimilación del nitrógeno acumulado en la fotorrespiración y reducción de nitrato o metabolismo de aminoácidos. En presencia de Finale® las plantas no resistentes acumulan amonio, sufren una rápida inhibición de la fotosíntesis y mueren (Wendler *et al.*, 1990).

La identificación y selección de eventos de transformación depende del crecimiento diferencial, en presencia del agente de selección, del tejido transformado en relación con el no transformado. El proceso de selección puede tomar entre seis y diez semanas y requiere el uso de diferentes concentraciones del agente de selección para eliminar escapes (Malabika *et al.*, 2000). Diferentes variedades de arroz exhiben diferentes sensibilidades hacia los agentes de selección. Es común que existan concentraciones de Finale® que no son lo suficientemente tóxicas, a las cuales las plantas sobreviven debido a una tolerancia basal al herbicida, y esto puede alterar la selección del material vegetal verdaderamente resistente. Por esta razón, para obtener plantas transgénicas resistentes a Finale®, es necesario conocer las concentraciones tóxicas mínimas del herbicida que causan la muerte de la especie de interés durante el cultivo *in vitro*.

En este trabajo se determinó la mínima concentración de Finale® que inhibió tanto la germinación *in vitro* de semillas como la formación de brotes a partir de callos en las variedades cubanas de arroz IACuba-17 e IACuba-19. El ulterior propósito de esta determinación es establecer un método efectivo de selección que incluya el Finale® como agente de selección en la obtención de plantas transgénicas en ambas variedades de arroz. El empleo del gen *bar* como gen marcador de selección, eliminaría el uso del gen que codifica para la higromicina fosfotransferasa (HPT), evitando de este modo los aspectos de percepción pública inherentes a la utilización de un antibiótico como marcador de selección.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas maduras de dos variedades cubanas de arroz (*Oryza sativa* L.) IACuba-17 e IACuba-19, las cuales fueron obtenidas de la Estación Experimental de Arroz "Sur del Jíbaro" de la provincia de Sancti Spíritus.

Finale®

Para determinar la influencia de Finale® sobre la germinación de semillas y regeneración de brotes a partir de callos se utilizó el procedente de la Firma Comercial AGREVO, que contiene 150 gramos de ingrediente activo por litro de formulación.

Desinfección

Las semillas fueron descascaradas manualmente y se desinfectaron embebiéndolas un minuto y medio en etanol 90% con agitación vigorosa y continua. Seguidamente fueron sumergidas 20 minutos en 2.5% de Hipoclorito de Sodio y se agitaron ocasionalmente. Finalmente se lavaron con agua destilada estéril y se secaron sobre papel de filtro estéril en una cabina de flujo laminar.

Formación de callos

Las semillas desinfectadas fueron colocadas, a razón de 10 semillas por placas de Petri (100 x 20 mm), sobre 25 ml de medio de cultivo N6 semisólido (Chu *et al.*, 1975) suplementado con 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 1 g.l⁻¹ de hidrolizado de caseína y solidificado con 3 g.l⁻¹ de fitagel. Las semillas se incubaron de 21 a 30 días en condiciones de oscuridad a 27 ± 1°C y al cabo de este tiempo los callos con estructuras embriogénicas formados fueron colectados y se utilizaron en experimentos de evaluación de tolerancia al agente de selección durante la regeneración.

Efecto del Finale® en la germinación de semillas

Se sembraron 15 semillas por placa de Petri de 100 x 20 mm. Cada una contenía 25ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) enriquecido con 30g.l⁻¹ de sacarosa, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol y 3g.l⁻¹ de fitagel como agente gelificante. En dependencia del tratamiento las placas contenían las siguientes concentraciones del herbicida Finale®: 0, 1, 3, 5, 10, 15 y 20mg.l⁻¹ respectivamente y se emplearon tres placas por cada tratamiento. Se realizaron dos evaluaciones: una a los 10 días y la otra a las tres semanas y en ambas se determinó el número de semillas germinadas y la altura de las plantas (cm) medida desde el comienzo del tallo hasta el ápice del primordio. La concentración a la cual se inhibió totalmente la germinación fue tomada como mínima inhibitoria.

En todos los casos las placas de Petri se incubaron inicialmente durante 30 horas en la oscuridad a 27 ± 1°C y posteriormente se sometieron a un régimen de fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, a 27 ± 1°C.

Regeneración de brotes a partir de callos en presencia de Finale®

La regeneración de brotes se realizó en placas de Petri de 100 x 20 mm que contenían 25 ml del medio de cultivo de regeneración KIBAN (Coll *et al.*, 1998). Se utilizaron, para cada variedad, un total 800 callos de 5-6 mm de diámetro. La preinducción de brotes se realizó durante 0, 2, 4 y 6 días en el medio de cultivo KIBAN sin agente de selección. Transcurridos el tiempo de preinducción establecido para cada tratamiento los callos fueron transferidos al mismo medio de cultivo de regeneración con la presencia de Finale® a las siguientes concentraciones: 0, 1, 3, 5, 10, 15 y 20 mg.l⁻¹. A las tres semanas se realizó la evaluación donde se cuantificó el número de callos con brotes.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza completamente aleatorizado. Se efectuó una comparación múltiple de medias con la prueba de Student-Newman-Keuls y LSD, haciendo uso del programa COSTAT 2.04.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto del Finale® en la germinación de semillas

El efecto inhibitorio del Finale® sobre la germinación de semillas de las variedades de arroz IACuba-17 e

IACuba-19 fue comprobado. El porcentaje de semillas germinadas y la altura promedio de las plantas decrecieron con el aumento de la concentración del herbicida según se muestra en las tablas 1 y 2.

En la evaluación realizada a los 10 días se encontró que 5 y 10 mg.l⁻¹ de Finale® inhibieron totalmente la germinación de IACuba-17 e IACuba-19, respectivamente. Estas concentraciones inhibitorias fueron iguales a las referidas para esta especie vegetal por Sandhu *et al.* (2002). La influencia de la variedad en los niveles de tolerancia al herbicida quedó demostrada para la germinación con una significación estadística ($p=0.05$), sin embargo, al analizar la altura promedio de las plantas no se encontraron diferencias significativas entre las variedades ($p=0.05$). A las concentraciones inhibitorias se distinguió la necrosis tisular por el cambio de color de los primordios de verde a amarillo y se manifestó un limitado crecimiento de los embriones de las semillas, que apenas lograron emitir una débil raíz y nunca la primera hoja completa.

La germinación es favorecida por la actividad de numerosas enzimas engendradas por la base proteica de los cotiledones, que utilizan las reservas a favor del embrión. Entre ellas se encuentran catalasas, amilasas, sacarasa, maltasa, que actúan sobre las reservas de las semillas para transformarlas en sustancias nutritivas utilizadas por la planta joven. El embrión y después la plántula, hasta la tercera hoja primaria inclusive, se desarrollan totalmente a partir de las reservas del grano o semilla (Angladette, 1969).

Tabla 1. Efecto del Finale® sobre la germinación de semillas de arroz de las variedades IACuba-17 e IACuba-19 en medio de cultivo MS al cabo de 10 días de cultivo.

Variedad	Finale® (mg.l ⁻¹)													
	0 ^c		1 ^c		3 ^b		5 ^a		10 ^a		15 ^a		20 ^a	
	% ¹	A	%	A	%	A	%	A	%	A	%	A	%	A
IACuba-17	96.6	1.88	86.6	0.80	20.0	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0
IACuba-19	100	2.06	97.8	0.42	20.0	0.17	15.5	0.27	0	0	0	0	0	0

¹ Porcentaje de germinación, A – Altura promedio de las plantas (cm).

Medias con letras diferentes denotan diferencias significativas entre las concentraciones al analizar porcentaje de semillas germinadas (Prueba de Student –Newman-Keuls, $\alpha=0.05$)

Tabla 2. Efecto del Finale® sobre la germinación de semillas de arroz variedades IACuba-17 e IACuba-19 en medio de cultivo MS al cabo de tres semanas de cultivo.

Variedad	Finale® (mg.l ⁻¹)													
	0 ^e		1 ^d		3 ^c		5 ^b		10 ^{ab}		15 ^a		20 ^a	
	% ¹	A	%	A	%	A	%	A	%	A	%	A	%	A
IACuba-17	100	4.44	73.3	1.54	33.3	0.54	6.66	4.40	11.1	0.17	2.22	0	0	0
IACuba-19	100	4.09	86.6	1.24	46.6	0.33	20.0	0.23	4.44	0.22	0	0	0	0

¹ Porcentaje de germinación, A – Altura promedio de las plantas (cm).

Medias con letras diferentes denotan diferencias significativas entre las concentraciones al analizar porcentaje de semillas germinadas (Prueba de Student –Newman-Keuls, $\alpha=0.05$)

En una segunda evaluación, realizada a las tres semanas, se comprobó que el efecto inhibitorio del Finale® sobre la germinación había disminuido: la inhibición de la germinación ocurrió a concentraciones entre 15 mg.l⁻¹ y 20 mg.l⁻¹ para cada variedad. Sung *et al.* (1996) examinaron, en una variedad de arroz tipo Indica, la herencia de un gen foráneo mediante germinación en un medio de cultivo que contenía PPT y la concentración inhibitoria establecida por ellos para la germinación fue de 2 mg.l⁻¹. La elevada concentración letal que se obtuvo en el ensayo a las tres semanas, en comparación con el referido, sugiere que el factor tiempo es determinante en los resultados finales del experimento, pues se corresponde con un agotamiento o degradación del agente de selección en el medio de cultivo lo que permite a las células una recuperación parcial del efecto negativo del Finale®, y ocurre una germinación tardía que tergiversa los resultados esperados.

Estos resultados sugieren que la concentración letal mínima de Finale® para la germinación de semillas de arroz debe quedar establecida a los 10 días de colocadas en medio de cultivo de germinación y que en el caso específico de las variedades IACuba-17 e IACuba-19, 5 y 10 mg.l⁻¹ de Finale® son suficientes para la evaluación de semillas de plantas transgénicas por esta metodología.

Regeneración de brotes a partir de callos en presencia de Finale®

Un importante paso en la obtención de plantas transgénicas de arroz lo es la regeneración de brotes en los callos sometidos a presión de selección.

Las figuras 1A y 1B muestran los resultados obtenidos para cada variedad a las tres semanas de aplicación de Finale®. La influencia de la variedad fue significativa ($p=0.05$), el 100 % de los callos de la variedad IACuba-19 colocados directamente en medio de cultivo con Finale®, correspondientes a cero (0) días de preinducción, fueron capaces de emitir brotes, mientras solamente el 65 % de los de la variedad IACuba-17 lo lograron. Este resultado se mantuvo incluso para los callos con dos días de preinducción aún cuando en ambos cultivares el porcentaje de callos con brotes, para cada concentración de Finale®, aumentó a medida que se incrementó el tiempo de preinducción de brotes en KIBAN sin Finale®.

La concentración letal mínima de Finale® en la formación de brotes a partir de callos de 4 y 6 días de preinducción resultó por encima de 10 mg.l⁻¹ en ambas variedades. Esta concentración estuvo muy por encima de la obtenida por Wan y Lemaux (1994)

que utilizaron 3mg.l⁻¹ para cebada (*Hordeum vulgare*) y a la sugerida por Sonriza *et al.* (1999) quienes usaron una concentración de fosfinotricina de 4mg.l⁻¹ como agente de selección también en la regeneración de brotes de cebada.

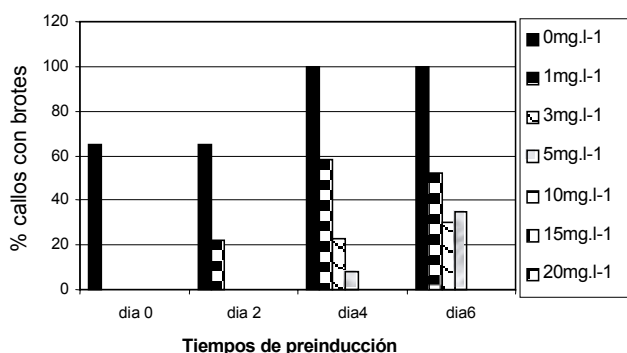
El tiempo de preinducción en medio de cultivo de regeneración con un adecuado balance de reguladores del crecimiento y en ausencia del agente de selección posibilita en los callos la formación de embriones somáticos, que más tarde darán lugar a los brotes. Mientras mayor sea el tiempo de preinducción mayor es el grado de desarrollo de los embriones somáticos por lo que al transferir dichos callos al medio de cultivo de regeneración, ahora en presencia del agente de selección, las células más desarrolladas de los embriones somáticos son más tolerantes al Finale® y continúan el proceso de regeneración previamente iniciado en ausencia del herbicida, mientras que las menos desarrolladas son menos tolerantes y manifiestan rasgos de necrosis paulatina y comienzan a extinguirse los brotes incipientes.

La combinación más conveniente para la selección de brotes resistentes a Finale® resultó la de 2 días de preincubación y aplicar después 3 mg.l⁻¹ del herbicida, pues fue la concentración mínima a la cual no aparecieron brotes.

Esta metodología fue diseñada para ser empleada en el proceso de transformación genética de arroz, pues durante la primera etapa sin agente de selección se garantiza la multiplicación y recuperación de las células transformadas en un medio de cultivo que al mismo tiempo promueve la formación de brotes. La posterior selección con la concentración inhibitoria definida permitió la continuidad del proceso de regeneración previamente inducido en los clones resistentes y se aceleró la obtención de brotes respecto al caso en que se iniciara la regeneración directamente sobre el agente de selección.

El procedimiento descrito redujo a tres semanas el tiempo de cultivo *in vitro* del material vegetal transformado, respecto las nueve semanas que requiere la metodología tradicional de seleccionar los callos en medio de cultivo crecimiento N6-2 con Finale® para luego transferirlos a medio de cultivo de regeneración. Este es un factor importante en la eficiencia del procedimiento, ya que alargar el tiempo de cultivo *in vitro* puede inducir variaciones somaclonales, anomalías fenotípicas, además de la presencia del regulador de crecimiento 2,4-D en el medio de cultivo N6-2 que en períodos prolongados y elevadas concentraciones puede actuar como agente mutagénico sobre los explantes. (Arencibia *et al.*, 1998).

A. Efecto del herbicida Finale® sobre la regeneración de brotes a partir de callos de arroz de la variedad IAC-17



B. Efecto del herbicida Finale® en la regeneración de brotes a partir de callos de arroz de la variedad IAC-19

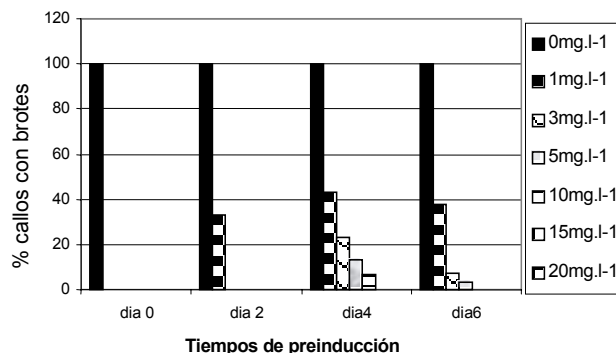


Figura 1. Porcentaje de callos con brotes de las variedades de arroz IACuba-17 (1A) e IACuba-19 (1B) a las tres semanas en medio de cultivo con Finale®.

CONCLUSIONES

El herbicida Finale® inhibió tanto la germinación *in vitro* de semillas como la regeneración de brotes a partir de callos en las variedades cubanas de arroz IACuba-17 e IACuba-19. La concentración letal mínima para la germinación se estableció a los 10 días de colocadas las semillas en medio de cultivo de germinación con 5 y 10 mg.l⁻¹ de Finale® para IACuba-17 e IACuba-19, respectivamente. Para la selección de brotes formados a partir de callos la combinación más conveniente resultó ser 2 días de preincubación y aplicar después 3 mg.l⁻¹ del herbicida en ambas variedades.

REFERENCIAS

- Angladette, A (1969) Fisiología del arroz. El arroz. Editorial Blume, Barcelona
- Arencibia, A, Gentinetta E, Cuzzoni E, Castiglione S, Kohli A, Vain P, Leech M, Christou P, Sala F (1998) Molecular analysis of the genome of transgenic rice *Oryza sativa* L plants produced via particle bombardment in intact cell electroporation. *Molecular Breeding* 4: 99-109
- Barry, G, Kishore G, Padgett S, Taylor M, Kolacz K, Weldon M, Eichholtz D, Fincher K, Hallas L (1992) Inhibitors of amino acids Biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. En: BK Singh, H E Flores, JC Shannon (Eds). *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*, pp.139-145. Amer Soc. Plant Physiol, Rockville.
- Cao, J, Duan X, McElroy D, Wu R (1992) Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep.* 11:585-591
- Christensen, AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing and promoter activity following transfer to protoplast by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689
- Chu, CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin CC, Chu CY, Bi FO (1975) Establishment of an efficient medium for anther

culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18: 659-668

Coll, Y, Pujol M, Castillo D, González A, Alfonso J, Armas R (1998) Improvement of Indica (*Oryza sativa* L) *in vitro* regeneration efficiency from callus mediated by stress. *Cereal Research Communications* 26:153-160

Goto, F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat Biotechnol* 17: 282-286

Herd, RW (1991) Research priorities for rice biotechnology. En: GH Toenniesse, Khush G (Eds). *Rice Biotechnology*, pp.19-54. CAB International, Wallingford

Krattinger, AF (1997) Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. International Service for acquisition of Agri-biotech Application Briefs 2, ISAAA, Ithaca.

Malabika, R (2000) Production or agronomically superior transgenic rice plants using *Agrobacterium* transformation methods. Present status and future perspectives. *Current Science* 79: 954-960

Messeguer, J, Fogher C, Guiderdoni E, Marfa V, Catala MM, Baldi G, Mele E (2001) Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa*) using a herbicide resistance gene as tracer marker. *Theor. Appl. Genet.* 103:1151-1159

Messeguer, J, Marfa V, Catala MM, Guiderdoni E, Melé E (2004) A field study of pollen – mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and red rice weed. *Molecular Breeding* 13: 103-112

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid grow and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15: 473-479

Sandhu, SS, Bastos CR, Azini LE, Tulman AN, Colombo C (2002) RAPD analysis of herbicide-resistant Brazilian rice lines produced via mutagenesis. *Genet. Mol. Res.* 4: 359-370

Sonriza, RG, Riley A, Cannell M, Barcelo P, Paul A (1999) A facile method for screening for phosphinothricin (PPT)-resistant transgenic wheats. *Molecular Breeding* 5: 255-262

- Sung, H, Shannon R, Roberta H (1996) T-ADN integration into genomic ADN of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. *Plant molecular Biology* 32:1135-1148
- Toenniessen, G, Khush G (1999) Prospects for the future . En: GH Toenniessen, Khush G (Eds). *Rice Biotechnology*. pp. 309-314. CAB International. Wallingford
- Toki, S (1997) Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:16-27
- Wan, Y, Lemaux P (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* 104: 37-48
- Wendler, CM, Barniske M, Wild A (1990) Effect of phosphinithricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C3 and C4 plants. *Photosyn. Res.* 24: 55-61